Ueber Kohlenoxydhämoglobin und die Reaktion zwischen Hämoglobin und Ferricyankalium

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

genehmigt

von der Philosophischen Fakultät der Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin

Von

HERBERT SCHÜLER

Berlin-Steglitz

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Februar 1933
Tag der Promotion: 31. Mai 1933

Druck: Doktordruck — Graphisches Institut Paul Funk, Berlin SW 68, Friedrichstr. 231.

335

Referenten: Prof. Dr. Schlenk
Prof. Dr. Bodenstein

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

I. Das Gleichgewicht zwischen Kohlenoxyd und Hämoglobin.

II. Globin und Ferricyankalium.

III. Kohlenoxydhämoglobin und Ferricyankalium.

IV. Oxydationspotential des Hämoglobins.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544301_0122

Läßt man Ferricyankalium in schwach-alkalischer Lösung auf Hämoglobin (Hb) einwirken, so oxydiert das Eisen des Ferricyanids das Eisen des Hämoglobins zu dreiwertigem Eisen des Methämoglobins (HbOH):

(I) $[K_3FeCy_6] + [Hb] + [KOH] = [K_4FeCy_6] + [HbOH]$

Die Reaktion ist von G. Hüfner[1]) gefunden und von J. Haldane[2]) und J. Barcroft[3]) für Hämoglobinbestimmungen im Blut benutzt worden. Im allgemeinen verläuft die Reaktion vollständig von links nach rechts, so daß also das Gleichgewicht:

(II) $$\frac{[K_3FeCy_6] \cdot [Hb]}{[K_4FeCy_6] \cdot [HbOH]} = K$$

im allgemeinen nicht gemessen werden kann. Sättigt man jedoch die Lösungen mit Kohlenoxyd, so wird wegen der Reaktion:

(III) $[HbCO] \rightleftharpoons [Hb] + [CO]$

(IV) $$\frac{[Hb] \cdot [CO]}{[HbCO]} = k_{co}$$

die Konzentration an freiem Hämoglobin sehr klein[4]). Dann verläuft die Gegenreaktion nach Gleichung I mit meßbarer Geschwindigkeit, und man kann, wie ich gefunden habe, das Gleichgewicht (II) bestimmen.

Ich habe also das Gleichgewicht zwischen Ferricyankalium und Hämoglobin einerseits, und Ferrocyankalium und Methämoglobin andererseits in kohlenoxydgesättigten wässerigen Lösungen untersucht. Die Bilanzgleichung in diesen Lösungen ist:

(I) $[K_3FeCy_6] + [Hb] + [KOH] \rightleftharpoons [K_4FeCy_6] + [HbOH]$

(III) $[HbCO] \rightleftharpoons [Hb] + [CO]$

(V) $[K_3FeCy_6] + [HbCO] + [KOH] \rightleftharpoons [K_4FeCy_6] + [HbOH] + [CO]$

und das Gleichgewicht ist, indem man Hb mittels (IV) aus (II) eliminiert:

(VI) $$\frac{[K_3FeCy_6] \cdot \frac{[HbCO]}{[CO]} \cdot k_{co}}{[K_4FeCy_6] \cdot [HbOH]} = K$$

Die hier untersuchte Reaktion, bei der zwei komplex gebundene Eisenatome ein Elektron bis zu einem Gleichgewichtszustand austauschen, ist physikalisch-chemisch und physiologisch interessant. So kann man beispielsweise aus dem Gleichgewichtszustand das Oxydationspotential des Hämoglobins, das direkt nicht bestimmbar ist, berechnen.

I. Das Gleichgewicht zwischen Kohlenoxyd und Hämoglobin.

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten von Kohlenoxydhämoglobin diente mir G. Hüfners Dissoziationsgleichung:

$$k_{co} = \frac{[Hb] \cdot [CO]}{[HbCO]}$$ [5])

Für meine Bedingungen: Meerschweinchenhämoglobinkristalle, gelöst in $\frac{m}{10}$ Borat $p_H = 9{,}5$ traf diese Gleichung zu. Würde man die von A. V. Hill[6]) entwickelte Theorie anwenden, so heißt das: Hämoglobin reagiert mit Kohlenoxyd bzw. Sauerstoff folgendermaßen:

$$[Hb] + [CO] \rightleftharpoons [HbCO]$$

und nicht: $[Hb_4] + 4\,[CO] \rightleftharpoons [Hb_4CO_4]$

Zur Bestimmung der Dissoziation des Kohlenoxydhämoglobins sind verschiedene Methoden ausgearbeitet: von Haldane[7]) stammt eine kolorimetrische, mit der er das Verhältnis $\frac{\text{Kohlenoxydhämoglobin}}{\text{Oxyhämoglobin}}$ bestimmte. Barcroft[8]) und Hecht haben eine Methode ausgearbeitet, nach der sie unter Wasserstoff Kohlenoxydhämoglobin dissoziieren lassen und das freie Hämoglobin in Oxyhämoglobin verwandeln. Das Verhältnis $\frac{\text{Kohlenoxydhämoglobin}}{\text{Oxyhämoglobin}} = \frac{\text{Kohlenoxydhämoglobin}}{\text{freies Hämoglobin}}$ bestimmen sie mittels des Spektroskopes von Hartridge[9]). Barcroft fand mit dieser Methode für Blut von Schafen bei $p_H = 7$ und $t = 15°$ eine Sättigung des Hämoglobins mit Kohlenoxyd von 50 % bei einem Kohlenoxyddruck von 0,0075 mm Hg.

Mit steigender Alkalität wird die Dissoziation verringert. Bei einem p_H von 9.5 konnte ich das Verhältnis $\frac{\text{Kohlenoxydhämoglobin}}{\text{freies Hämoglobin}}$ direkt nur bei sehr niedrigen Kohlenoxyddrucken messen. Die Bestimmung geschah manometrisch in den Apparaten von O. Warburg[10]), indem ich den Kohlenoxyddruck sich selbst einstellen ließ durch das aus Kohlenoxydhämoglobin dissoziierende Kohlenoxyd.

Ging ich zu höheren Kohlenoxyddrucken über, so war freies Hämoglobin nicht mehr zu messen. Ich nahm jetzt die Messung in

Kohlenoxyd-Sauerstoff-Gemischen vor und bestimmte das Verhältnis: $\frac{\text{Kohlenoxydhämoglobin}}{\text{Oxyhämoglobin}}$; hieraus konnte ich k_{co}, die Dissoziationskonstante von Kohlenoxydhämoglobin berechnen; denn es ist:

$$k_{co} = \frac{[Hb] \cdot [CO]}{[HbCO]}$$

$$k_{o_2} = \frac{[Hb] \cdot [O_2]}{[HbO_2]} \; ; \; [Hb] = \frac{k_{o_2} \cdot [HbO_2]}{[O_2]}$$

$$k_{co} = k_{o_2} \cdot \frac{[HbO_2] \cdot [CO]}{[HbCO] \cdot [O_2]}$$

Kenne ich die Kohlenoxyd- und die Sauerstoffmenge, ist mir ferner k_{o_2} bekannt, so erhalte ich durch den Versuch (Bestimmung von $\frac{\text{Kohlenoxydhämoglobin}}{\text{Oxyhämoglobin}}$) k_{co}.

Für diese Methode mußte ich also noch k_{o_2} bestimmen. Ich erhielt es durch Kapazitätsbestimmung nach J. Haldane[2]) und J. Barcroft[3]) von Oxyhämoglobinlösungen in $\frac{m}{10}$ Borat $p_H = 9.5$ bei verschiedenen Sauerstoffdrucken. Die Differenz gegen eine Kapazitätsbestimmung in 100 % Sauerstoff ergab die Menge freien Hämoglobins. Eine Kapazitätsbestimmung in 100 % Kohlenoxyd und 100 % Sauerstoff ergab eine Differenz, die aber nicht freies Hämoglobin war, sondern, wie ich fand, von einer Eisenkarbonylverbindung des Hämoglobins herrührt, die gleichfalls bei Zugabe von Ferricyanid Kohlenoxyd abgibt.

Die optische Methode zur Bestimmung von k_{co} in Kohlenoxyd-Sauerstoff-Gemischen war nur bis zu einem Kohlenoxyddruck von 1000 mm Brodie anwendbar. 10 000 mm Brodie = 760 mm Hg. In dem Gebiet zwischen 1000 mm bis 10 000 mm Brodie Kohlenoxyddruck konnte k_{co} nur indirekt aus dem Gleichgewicht der Reaktion von Kohlenoxydhämoglobin mit Ferricyanid:

$$K = k_{co} \cdot \frac{HbCO \cdot K_3FeCy_6}{HbOH \cdot K_4FeCy_6 \cdot p_{co}}$$

ermittelt werden. Traf diese Gleichung für 1000 mm wie für 10 000 mm Brodie Kohlenoxyddruck zu, so mußte auch k_{co} in beiden Fällen gleich sein. Dies war bei den Versuchen der Fall. Gefunden wurde für k_{co}: 0,04 (mm Brodie).

II. Globin und Ferricyanid.

Für das Gleichgewicht der Reaktion zwischen Kohlenoxydhämoglobin und Ferricyanid ist als Gleichung aufgestellt:

$$K = k_{co} \cdot \frac{HbCO \cdot K_3FeCy_6}{HbOH \cdot K_4FeCy_6 \cdot p_{co}}$$

Es wurde zunächst angenommen, daß zur Oxydation eines Hämoglobinmoleküls ein Äquivalent Ferricyanid verbraucht wird, daß also die ausgetriebene Kohlenoxydmenge gleich ist dem gebildeten Methämoglobin und Ferrocyanid. Nach diesen Berechnungen konnte aber keine Gleichgewichtskonstante erhalten werden. Weiter zeigte es sich, daß bei Zugabe größerer Mengen Ferricyanid zu Kohlenoxydhämoglobin sich tatsächlich ein Gleichgewicht einstellt, das auch von der anderen Seite der Reaktion — Methämoglobin und Ferrocyanid — erhalten wird, dagegen bei Zugabe kleiner Mengen Ferricyanid das anfangs ausgetriebene Kohlenoxyd langsam wieder aufgenommen wird. Diese Kohlenoxydaufnahme ist keine Kohlenoxydverbrennung zu Kohlensäure, wie sie E. Negelein[11]) bei grünen Häminen fand, auch keine Reduktion des Methämoglobins zu Hämoglobin durch Verunreinigungen. Das Zurückgehen konnte schließlich nur noch eine Reduktion des Methämoglobins durch Globin selbst bedeuten. Es erschien dann wahrscheinlich, daß Ferricyanid auch Globin oxydiert. Das nach H. Wu[12]) aus Methämoglobin dargestellte, nicht denaturierte Globin muß demnach bereits oxydiert sein. Es gelang mir aber, dieses Globin durch Schwefelwasserstoff zu reduzieren. Das Reduktionsprodukt wurde bald nach seiner Darstellung in $\frac{m}{10}$ Borat $p_H = 9.5$ mit Ferricyanid geschüttelt. Ein Mol. Globin wurde durch 2 Mole Ferricyanid oxydiert. M. L. Anson und A. E. Mirsky[13]) haben gefunden, daß denaturiertes Globin die Nitroprussidnatriumreaktion auf SH zeigt. Es war zu vermuten, daß die Gruppen in Globin, die durch Ferricyanid oxydiert und durch Schwefelwasserstoff reduziert werden, SH-Gruppen sind. Dann mußte das reduzierte Globin Rotfärbung mit Nitroprussidnatrium zeigen, das oxydierte Globin dagegen nicht. Rotfärbung mit Nitroprussidnatrium zeigte, daß SH-Gruppen im reduzierten Globin vorhanden sind; die Reaktion verlief negativ bei oxydiertem Globin. Der Versuch wurde nach F. Hopkins[14]) ausgeführt.

Es wurde nun reduziertes Globin direkt aus kristallisiertem Kohlenoxydhämoglobin dargestellt. Auch dieses Globin verbrauchte für 1 Molekül 2 Ferricyanid-Äquivalente und gibt die Nitroprussidnatriumreaktion.

Weiter wurde gefunden: reduziertes Globin wird durch Luftsauerstoff oxydiert. Die Messung geschah manometrisch; es wurde die Sauerstoffaufnahme beobachtet, die beim Schütteln einer reduzierten Globinlösung in $\frac{m}{10}$ Borat $p_H = 9.5$ mit Luft stattfindet.

Reduziertes Globin und Hämin bilden in Kohlenoxyd über Methämoglobin (Globin reduziert) Kohlenoxydhämoglobin (Globin oxydiert). Auch diese Messung erfolgte manometrisch durch Beobachten der Kohlenoxydaufnahme. Am Ende des Versuchs wurde das

Spektrum des Kohlenoxydhämoglobins beobachtet. Durch diesen Versuch ist die Wiederaufnahme des entwickelten Kohlenoxyds bei den Gleichgewichtsbestimmungen erklärt; ein weiterer Beweis dafür, daß die Kohlenoxydaufnahme durch Reduktion des Methämoglobins hervorgerufen wird, ist die Hemmung dieser Aufnahme durch Blausäure.

Ferner konnte mit reduziertem Globin reversibles Oxyhämoglobin dargestellt werden.

Um zu sehen, ob der ganze Schwefel als SH im Globin vorliegt, wurde der Schwefelgehalt des Hämoglobins bestimmt. Dabei wurde der Schwefelgehalt auf den Eisengehalt des Hämoglobins bezogen. Gefunden wurden 4 Schwefelatome auf 1 Eisenatom, also auf 1 Globinmolekül.

Es sind 2 Schwefelatome nicht als SH-Gruppen im Globin vorhanden.

III. Kohlenoxydhämoglobin und Ferricyanid.

Gebe ich Ferricyanid zu Hämoglobin in Kohlenoxyd, so erhalte ich ein meßbares Gleichgewicht, das sich auch von der anderen Seite der Reaktion — Methämoglobin und Ferrocyanid — einstellt.

Durch Bestimmen der Reaktionsteilnehmer in diesem Gleichgewicht erhalte ich eine Gleichgewichtskonstante. Kohlenoxydhämoglobin und Methämoglobin werden manometrisch bestimmt, indem ich die entstandene oder aufgenommene Kohlenoxydmenge messe. Das entstandene Methämoglobin ist gleich der gebildeten Menge Kohlenoxyd. Ferricyanid und Ferrocyanid werden durch Titration nach Mecklenburg[15]) bestimmt.

Ist die Annahme richtig, daß Ferricanid nur mit freiem Hämoglobin reagiert, so muß die Geschwindigkeit der Hinreaktion abhängig sein vom Kohlenoxyddruck, die Geschwindigkeit der Rückreaktion unabhängig nach der Gleichung:

$$[Hb] + [K_3FeCy_6] + [KOH] \rightleftharpoons [HbOH] + [K_4FeCy_6]$$

oder setze ich für Hb: $Hb = k_{co} \cdot \frac{HbCO}{CO}$ ein,

$$\left[\frac{HbCO}{CO} \cdot k_{co}\right] + [K_3FeCy_6] + [KOH] \rightleftharpoons [HbOH] + [K_4FeCy_6]$$

Es wurde durch Versuch bestätigt:

Die Geschwindigkeit der Hinreaktion steigt mit verringertem Kohlenoxyddruck, die Geschwindigkeit der Rückreaktion ist unabhängig vom Kohlenoxyddruck. Nach der Gleichung des Gleichgewichts:

$$K = k_{co} \cdot \frac{HbCO \cdot K_3FeCy_6}{HbOH \cdot K_4FeCy_6 \cdot p_{co}}$$

muß das Gleichgewicht vom Kohlenoxyddruck abhängig sein; das ist in der Tat der Fall, das Gleichgewicht ändert sich bei variiertem Kohlenoxyddruck gemäß der genannten Gleichung.

Die Gleichgewichtskonstante ist nach den Versuchen abhängig vom Gehalt an Neutralsalzen, und zwar bewirkt ein Zusatz an Salzen eine Verschiebung des Gleichgewichts nach der Methämoglobinseite. Die einzelnen Salze üben verschiedene Wirkung aus. Diese Wirkung ist vielleicht in einer Beeinflussung der Aktivitäten der Reaktionsteilnehmer zu suchen, wie L. Michaelis[16]) und P. Debye und Hückel[17]) für viele Gleichgewichte gefunden haben.

Für die Gleichgewichtskonstante:

$$K = k_{co} \cdot \frac{HbCO \cdot K_3FeCy_6}{HbOH \cdot K_4FeCy_6 \cdot p_{co}}$$

gemessen an Meerschweinchenhämoglobin in $\frac{m}{10}$ Borat $p_H = 9.5$ bei 20° und bei einer Gesamtcyanidkonzentration von 448 $\frac{cmm}{ccm}$, wurde gefunden: $K = 4 \cdot 10^{-7}$.

IV. Oxydationspotential des Hämoglobin.

Aus dem Reaktionsgleichgewicht:

$$K = k_{co} \cdot \frac{HbCO \cdot K_3FeCy_6}{HbOH \cdot K_4FeCy_6 \cdot p_{co}} = \frac{Hb \cdot K_3FeCy_6}{HbOH \cdot K_4FeCy_6}$$

kann man das Potential des Systems Hämoglobin — Methämoglobin berechnen. Da nämlich das Oxydationspotential von Ferricyanid — Ferrocyanid bekannt ist, so kennt man für das angeführte Gleichgegewicht auch das Potential Hämoglobin — Methämoglobin, vorausgesetzt, daß das Potential Ferri — Ferrocyanid nicht durch Kohlenoxydhämoglobin — Methämoglobin (vielleicht durch Adsorption) beeinflußt wird. Zur Prüfung dieser Frage dienten Potentialmessungen, die an Ferricyanid-Ferrocyanid-Lösungen im Gleichgewicht mit Kohlenoxydhämoglobin und Methämoglobin und Versuchslösungen derselben Ferricyanid-Ferrocyanidkonzentrationen ohne Hämoglobin angestellt wurden. Es mußte in beiden Fällen das gleiche Potential sich einstellen, da beide Male die gleiche Ferricyanid-Ferrocyanidkonzentration herrscht. Dies war auch innerhalb eines Fehlers von wenigen Millivolt der Fall.

Die Gleichgewichtskonstante: $K = k_{co} \cdot \frac{HbCO \cdot K_3FeCy_6}{HbOH \cdot K_4FeCy_6 \cdot p_{co}}$

ist, wie früher gesagt, für Meerschweinchenhämoglobin in $\frac{m}{10}$ Borat $p_H = 9.5$ bei 20° und einer Gesamtcyanidkonzentration von 448 $\frac{cmm}{ccm}$, $K = 4 \cdot 10^{-7}$.

Nehmen wir an, die Konzentration des Ferricyanids wie des Ferrocyanids sei im Gleichgewicht 224 $\frac{cmm}{ccm}$, so ist $\frac{Hb}{HbOH} = 4 \cdot 10^{-7}$.

Für das Potential von $\frac{m}{100}$ K_3FeCy_6 — $\frac{m}{100}$ K_4FeCy_6 in $\frac{m}{10}$ Borat p_H = 9.5 unter Kohlenoxyd bei 20° wurden 0,1800 V gegen die Kalomelelektrode gemessen; dasselbe Potential gilt nun auch für $\frac{HbOH}{Hb} = 2{,}5 \cdot 10^6$. Das Potential Hämoglobin — Methämoglobin ist also für die genannten Bedingungen:

$E_0 \quad E = -\frac{RT}{nF} \cdot \ln \frac{c_1}{c_2}\left(\frac{Ox.}{Red.}\right)$; $E_0 \quad + 0{,}1800 - 0{,}058 \cdot \log 2{,}5 \cdot 10^6$

$E_0 = -0{,}1910$ V gegen Kalomelelektrode oder

$E_0 = +0{,}059$ V gegen Normal-Wasserstoffelektrode.

J. Conant[18]) fand für p_H 9,63 E_0 — 0,016 V gegen Normal-Wasserstoff-Elektrode.

Sämtliche Versuche sind mit Meerschweinchenhämoglobin, gelöst in $\frac{m}{10}$ Borat $p_H = 9.5$, ausgeführt.

Experimenteller Teil.

I. Darstellung von Hämoglobin, Methämoglobin und Mischkristallen

II. Bestimmung der Dissoziationskonstanten von Kohlenoxydhämoglobin

a) Bestimmunng bei 3 mm Brodie-Kohlenoxyd-Druck
b) Bestimmung bei 100 mm Brodie-Kohlenoxyd-Druck
c) Bestimmung bei 1000 mm Brodie-Kohlenoxyd-Druck
d) Bestimmung der Dissoziationskonstanten von Oxyhämoglobin zwischen 100—1000 mm Brodie-Sauerstoff-Druck
e) Über eine Reaktion des Eisen mit Kohlenoxydhämoglobin

III. Reduziertes Globin

a) Darstellung von reduziertem Globin
b) Oxydation des Globins durch Kaliumferricyanid
c) Oxydation des Globins durch Sauerstoff
d) Oxydation des Globins durch Hämin; Bildung von Hämoglobin
e) Reversibles Oxyhämoglobin
f) Nitroprossitnatriumreaktion auf SH
g) Schwefelbestimmung im Hämoglobin

IV. Bestimmung des Gleichgewichts: $K = k_{co} \frac{HbCO \cdot K_3Fe(Cr)_6}{HbOH \cdot K_4Fe(Cr)_6 \cdot p_{co}}$

a) Bestimmung von Kohlenoxydhämoglobin und Methämoglobin manometrisch
b) Bestimmung von Ferricyanid und Ferrocyanid durch Titration
c) Aufnahme des entwickelten Kohlenoxyd bei kleinen Kaliumferricyanid-Konzentrationen
d) Wirkung von Neutralsalzen auf das Gleichgewicht
e) Einfluß des Kohlenoxyddruckes auf das Gleichgewicht

V. Potentiometrische Messung des Gleichgewichts:

$$K = k_{co} \frac{HbCO \cdot K_3Fe(Cr)_6}{HbOH \cdot K_4Fe(Cr)_6 \cdot p_{co}}$$

I. Darstellung von Hämoglobin, Methämoglobin und Mischkristallen.

Die Reaktionsgeschwindigkeiten der Hämoglobine verschiedener Tierarten mit Ferricyanid verhalten sich verschieden. Geeignet für die Versuche war Meerschweinchenhämoglobin, da sich hier ein Gleichgewicht schnell einstellte, weniger geeignet Pferdehämoglobin.

Meerschweinchenblut wurde defibriniert, dreimal mit 0,9% NaCl-Lösung gewaschen und mit Wasser auf Blutvolumen aufgefüllt. Durch eine Stunde Stehen bei 38° wurde cytolysiert, durch kurzes Zentrifugieren die Stromata von den gebildeten Hämoglobinkristallen entfernt. Die Kristalle wurden 4 mal mit destilliertem Wasser gewaschen. Für einige Versuche wurde umkristallisiert. Wegen der Schwerlöslichkeit des Meerschweinchen-Hämoglobins in Wasser konnte die Umkristallisation nicht aus Wasser erfolgen. In $\frac{n}{20}$ NaOH oder $\frac{m}{10}$ Borat p_H 9.5 wurde bei 38° eine gesättigte Hämoglobinlösung hergestellt und bei Zimmertemperatur 5% Kohlensäure in Luft durch die Lösung geleitet, um die Alkalität abzustumpfen und so zu übersättigen. Es fielen sehr kleine Hämoglobinkristalle aus. Die Ausbeute betrug ungefähr 30% der Ausgangsmenge. Auch durch Zugabe von viel Kaliumchlorid zu gesättigten Lösungen erfolgte Kristallisation.

Methämoglobinkristalle wurden dargestellt, indem zu dem mit NaCl gewaschenem Blut die 15 fache Menge an Ferricyanid zugesetzt wurde und auf Blutvolumen mit H_2O aufgefüllt. Nach einer Stunde Stehen bei 38° war cytolysiert; die Kristalle wurden wie bei Hämoglobin von den Stromata gereinigt. Die Hämoglobin- und Methämoglobin-Kristalle wurden für die Versuche in $\frac{m}{10}$ Borat p_H 9.5 gelöst, die Kapazität der Lösungen durch Einkippen von viel Ferricyanid bzw. Hydrosulfit unter Kohlenoxyd im Manometer bestimmt.

Wurde zu einer gesättigten Kohlenoxyd-Hämoglobin-Lösung unter Kohlenoxyd die doppelte Menge Ferricyanid zugesetzt, so fielen Kristalle aus, die zur Hälfte Methämoglobin waren, zur Hälfte Kohlenoxydhämoglobin. Unter dem Mikroskop sahen die Kristalle einheitlich aus. Es handelt sich wahrscheinlich um Mischkristalle, die schwerer löslich sind, als die einzelnen Komponenten.

Protokoll I.

Die Kristalle wurden 5 mal mit Wasser gewaschen und wieder in $\frac{m}{10}$ Borat $p_H = 9.5$ gelöst. In je 2 ccm der Lösung wurde Hämoglobin und Methämoglobin manometrisch bestimmt. Temperatur 20°.

Nach Temperaturausgleich wurde der Birneninhalt zu dem Hauptraum gekippt, zur Zeit t = O.

	Gefäß I	Gefäß II
Hauptraum:	2 ccm der Kristall-lösung in $\frac{m}{10}$ Borat $p_H = 9.5$	→
Birne:	0,3 ccm 34% Ferricyanid-lösung	0,2 ccm $\frac{n}{10}$ NaOH + 3 mg Hydrosulfit
Gasraum:	100% CO	→
Nach dem Einkippen des Birneninhaltes: Minuten	cmm CO	cmm CO
5	+ 35,5	— 40,2
10	+ 37,0	— 40,2
20	+ 37,0	— 40,2

II. Bestimmung der Dissoziationskonstanten von Kohlenoxydhämoglobin.

a) Bestimmung bei 3 mm Brodie Kohlenoxyd-Druck.

Meerschweinchenhämoglobin in $\frac{m}{10}$ Borat $p_H = 9.5$ wurde durch Sättigen mit 100% Kohlenoxyd in Kohlenoxydhämoglobin umgewandelt; hierauf wurde 1% Kohlenoxyd in Argon eingeleitet, so daß in der Flüssigkeit möglichst wenig Kohlenoxyd gelöst war. Als keine Drucke mehr auftraten, wurde Sauerstoff und Kohlenoxyd-freies Argon durch das im Thermostaten stehende Manometer geleitet. Damit sich der Wasserdampfgehalt im Gasraum ausgleicht, wurde während des Stehens die Brodie in den Kapillaren kräftig bewegt. Nach 8 Minuten Ausgleichszeit wurde geschüttelt und die Menge dissoziierten Kohlenoxyds gemessen. Bei den Messungen ist zu berücksichtigen:

1. Bei 100 mm Brodie Kohlenoxyddruck sind bereits 0,05% des Gesamthämoglobins als freies Hämoglobin vorhanden.

2. Zu der gemessenen Kohlenoxydmenge kommt noch das bei 100 mm Brodie Kohlenoxyddruck in der Flüssigkeit gelöste Kohlenoxyd hinzu; dies sind bei einem Verhältnis von Flüssigkeitsvolumen zu Gasvolumen wie 1 : 7 (Versuchsbedingungen) für 20°:

$$\frac{100 \text{ mm}}{7} \cdot \alpha_{co} = \frac{100}{7} \cdot 0{,}023 \text{ mm} = 0{,}33 \text{ mm Brodie.}$$

α_{co} ist der Löslichkeitskoeffizient von Kohlenoxyd.

3. Der Löslichkeitskoeffizient α_{Argon} von Argon bei 20° ist größer als der von Kohlenoxyd; $\alpha_{Argon} = 0{,}035$; $\alpha_{co} = 0{,}023$.

Es werden also 0,50 — 0,33 mm Argon aufgenommen. Die Menge gebildeten freien Hämoglobins und Kohlenoxyds ist also um 0,17 mm größer als gemessen. Ein Fehler durch Sauerstoffgehalt des Argon kann nicht entstehen, da im Argon kein Sauerstoff gefunden wurde.

Ergebnis der Messungen:

	Menge HbCO in cmm	gemessene Menge Hb in cmm	korrigierte Menge Hb in cmm	gemessene Menge CO in cmm	korrigierte Menge CO in cmm	k_{co}
1.	395	3,8	4,2	2,5	3,0	0,032
2.	394	4,6	5,0	3,0	3,5	0,044
3.	394	5,0	5,4	3,5	4,0	0,055
4.	394	4,3	4,7	3,0	3,5	0,042
5.	394	3,5	3,9	2,4	2,9	0,029
6.	394	3,7	4,1	2,6	3,1	0,032
7.	281	3,1	3,5	2,2	2,7	0,034
8.	281	3,8	4,2	2,6	3,1	0,046
9.	281	3,7	4,1	2,6	3,1	0,045
10.	411	4,3	4,7	2,8	3,3	0,038
11.	411	5,1	5,5	3,6	4,1	0,055
12.	411	4,6	5,0	3,2	3,7	0,045

Im Mittel ergibt sich für k_{co} bei 3 mm Brodie Kohlenoxyddruck bei 20°: $k_{co} = 0{,}041$ mm Brodie.

b) Bestimmung bei 100 mm Brodie Kohlenoxyddruck.

Zur Ermittlung des Verhältnisses $\frac{\text{Kohlenoxydhämoglobin}}{\text{Oxyhämoglobin}}$ auf spektroskopischem Wege erwiesen sich die α-Banden von Kohlenoxydhämoglobin und Oxyhämoglobin geeignet, nicht geeignet waren wegen der geringen Differenz der Absorptionskoeffizienten die Hauptbanden. Bei den α-Banden war die geeignetste Wellenlänge

$\lambda = 582$. Hierfür ist: $\beta_{co} = 0{,}172 \cdot 10^8$; $\beta_{o_2} = 0{,}283 \cdot 10^8$ berechnet aus: $\beta = \frac{1}{c} \cdot \frac{1}{d} \cdot \ln \frac{i_o}{i}$; c ist hierbei in $\frac{\text{Mol}}{\text{ccm}}$ ausgedrückt.

Versuch 1:

Das Verhältnis $\frac{\text{Kohlenoxydhämoglobin}}{\text{Oxyhämoglobin}}$ wurde bei 1 % Kohlenoxyd in Sauerstoff bestimmt. Gemessen wurde bei $\lambda = 582$. Zum Vergleich wurde Kohlenoxydhämoglobin in 100 % Kohlenoxyd gemessen. 0,2 ccm Meerschweinchenhämoglobinlösung in $\frac{m}{10}$ Borat $p_H = 9.5$ (Kapazität = 32,4 cmm) wurden mit 20 ccm $\frac{m}{10}$ Borat $p_H = 9.5$ verdünnt, Kohlenoxyd durchgeleitet, geschüttelt und nochmals mit Kohlenoxyd gesättigt. 8 ccm der Lösung wurden schnell in die vorher mit Kohlenoxyd ausgespülte Küvette gebracht. Die Messung der Vergleichslösung ergab $\frac{i_o}{i} = 2{,}07$.

Der Rest der Lösung wurde mit 1 % Kohlenoxyd in Sauerstoff gesättigt, geschüttelt und wieder die Gasmischung durchgeleitet. Die Küvette wurde wie vorher gefüllt. $\frac{i_o}{i} = 2{,}58$.

Hämoglobinkonzentration $c = 7{,}12 \cdot 10^{-8} \frac{\text{Mol}}{\text{ccm}}$

Absorptionsfaktor der Küvette $d = 0{,}60$

$\beta_{co} = 0{,}172 \cdot 10^8$; $\beta_{o_2} = 0{,}283 \cdot 10^8$

Berechnung von $\frac{\text{Kohlenoxydhämoglobin}}{\text{Oxyhämoglobin}}$:

$\frac{i_o}{i}$ der Versuchslösung setzt sich zusammen aus $\left[\frac{i_o}{i}\right]_{HbO_2}$ und $\left[\frac{i_o}{i}\right]_{HbCO}$; $\ln \left[\frac{i_o}{i}\right]_{HbO_2} = c_1 \cdot \beta_{o_2} \cdot d$; $\ln \left[\frac{i_o}{i}\right]_{HbCO} = c_2 \cdot \beta_{co} \cdot d$; $\ln \frac{i_o}{i} = (c_1 \cdot \beta_{o_2} + c_2 \cdot \beta_{co}) \cdot d$; c_1 ist die Konzentration an Oxyhämoglobin, c_2 ist die Konzentration an Kohlenoxydhämoglobin: $c_1 + c_2 = c$. $\frac{1}{d} \cdot \ln \frac{i_o}{i} = \beta_{o_2} (c - c_2) + \beta_{co} \cdot c_2$.

Hieraus ergibt sich für: $c_1 = 3{,}24 \cdot 10^{-8}$; $c_2 = 3{,}88 \cdot 10^{-8} \frac{\text{Mol}}{\text{ccm}}$;

$\frac{\text{Kohlenoxydhämoglobin}}{\text{Oxyhämoglobin}} = 1{,}2$

Versuch 2:

Hämoglobinkonzentration $c = 7{,}12 \cdot 10^{-8} \frac{\text{Mol}}{\text{ccm}}$

Absorptionsfaktor der Küvette $d = 0{,}60$

$\beta_{co} = 0{,}172 \cdot 10^{8}$; $\beta_{o_2} = 0{,}283 \cdot 10^{8}$

$\frac{i_o}{i}$ des Versuches: 2,61

$c_1 = 3{,}42 \cdot 10^{-8}$; $c_2 = 3{,}70 \cdot 10^{-8} \frac{\text{Mol}}{\text{ccm}}$

$\frac{\text{Kohlenoxydhämoglobin}}{\text{Oxyhämoglobin}} = 1{,}1$; $\frac{\text{Kohlenoxydhämoglobin}}{\text{Oxyhämoglobin}}$ im Mittel: 1,15

$k_{co} = k_{o_2} \cdot \frac{HbO_2 \cdot CO}{HbCO \cdot O_2} = 0{,}037$ mm Brodie.

c) Bestimmung bei 1000 mm Brodie Kohlenoxyddruck.

Die gleiche Methode der Messung läßt sich wie bei 100 mm Brodie Kohlenoxyddruck auch noch auf 1000 mm Brodie Kohlenoxyddruck anwenden. Es wurde die Versuchslösung mit 10 % Kohlenoxyd in Sauerstoff gesättigt.

Die Ergebnisse aus drei Versuchen sind:

1. Hämoglobinkonzentration $c = 7{,}16 \cdot 10^{-8} \frac{\text{Mol}}{\text{ccm}}$

   Absorptionsfaktor der Küvette $d = 0{,}60$

   $\beta_{co} = 0{,}181 \cdot 10^{8}$; $\beta_{o_2} = 0{,}288 \cdot 10^{8}$

   $\frac{i_o}{i}$ des Versuches: 2,25

   $c_1 = 0{,}56 \cdot 10^{-8}$; $c_2 = 6{,}60 \cdot 10^{-8} \frac{\text{Mol}}{\text{ccm}}$

   $\frac{\text{Kohlenoxydhämoglobin}}{\text{Oxyhämoglobin}} = 11{,}8$

2. Hämoglobinkonzentration $c = 7{,}16 \cdot 10^{-8} \frac{\text{Mol}}{\text{ccm}}$

   Absorptionsfaktor der Küvette $d = 0{,}60$

   $\beta_{co} = 0{,}184 \cdot 10^{8}$; $\beta_{o_2} = 0{,}288 \cdot 10^{8}$

   $\frac{i_o}{i}$ des Versuches: 2,30

   $c_1 = 0{,}76 \cdot 10^{-8}$; $c_2 = 6{,}40 \cdot 10^{-8} \frac{\text{Mol}}{\text{ccm}}$

   $\frac{\text{Kohlenoxydhämoglobin}}{\text{Oxyhämoglobin}} = 9{,}0$

3. Hämoglobinkonzentration $c = 7{,}16 \cdot 10^{-8} \frac{\text{Mol}}{\text{ccm}}$

Absorptionsfaktor der Küvette = 0,60

$\beta_{co} = 0{,}176 \cdot 10^8$; $\beta_{o_2} = 0{,}285 \cdot 10^8$

$\frac{i_0}{i}$ des Versuches: 2,20

$c_1 = 0{,}56 \cdot 10^{-8}$; $c_2 = 6{,}60 \cdot 10^{-8} \frac{\text{Mol}}{\text{ccm}}$

$\frac{\text{Kohlenoxydhämoglobin}}{\text{Oxyhämoglobin}} = 11{,}8$

$\frac{\text{Kohlenoxydhämoglobin}}{\text{Oxyhämoglobin}} = x$ im Mittel: 10,9

$k_{co} = k_{o_2} \cdot \frac{HbO_2 \cdot CO}{HbCO \cdot O_2} = 0{,}043$ mm Brodie.

d) Bestimmung der Dissoziationskonstanten von Oxyhämoglobin zwischen 100 bis 1000 mm Brodie Sauerstoffdruck.

Die Kapazität von Oxyhämoglobinlösungen in $\frac{m}{10}$ Borat p_H 9.5 wurde bei verschiedenen Sauerstoffdrucken gemessen. Die Differenz gegen eine Kapazitätsbestimmung in 100 % Kohlenoxyd sollte das freie Hämoglobin ergeben.

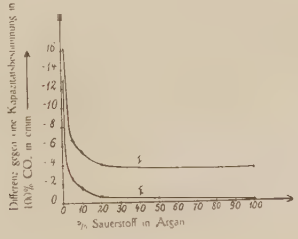

Abbildung 1

Kurve 1 zeigt die aus dem Versuch gewonnenen Differenzwerte gegen eine Kapazität von 311 cmm in 100 % Kohlenoxyd.

Kurve 2 zeigt die für $k_{o_2} = 4{,}2$ berechneten Werte.

Würde Kurve 1 um die Differenz von 100 % Kohlenoxyd und 100 % Sauerstoff — das sind 3,5 cmm — verlegt, würden Kurve 1 und 2 zusammenfallen. Diese Differenz zwischen 100 % Kohlenoxyd und 100 % Sauerstoff bedeutet offenbar kein freies Hämoglobin. Es bestand die Möglichkeit, daß Spuren einer Metallverbindung in der Hämoglobinlösung sich mit Kohlenoxyd verbinden, die dann wahr-

scheinlich auch mit Blausäure reagierten. Der Versuch wurde mit Blausäurezusatz wiederholt; zwischen den Kapazitäten, gemessen in 100 % Kohlenoxyd und 100 % Sauerstoff bestand diesmal keine Differenz; es ergab sich beide Male 307,5 cmm Kohlenoxyd. Die Dissoziationskonstante des Oxyhämoglobin ist demnach $k_{O_2} = 4{,}2$ (mm Brodie). Die Dissoziationskonstante des Kohlenoxydhämoglobins ist im Mittel: $k_{CO} = 0{,}040$ (mm Brodie).

e) Über eine Reaktion des Eisen mit Kohlenoxydhämoglobin.

Wurde $FeSO_4$ zu Kohlenoxydhämoglobin in $\frac{m}{10}$ Borat p_H 9.5 zugesetzt, so wurde Kohlenoxyd aufgenommen. Bei einer Kontrollbestimmung — $FeSO_4$ zu $\frac{m}{10}$ Borat $p_H = 9.5$ in Kohlenoxyd — fiel Eisenhydroxyd aus; es entstanden keine Drucke. Die Reaktion habe ich noch nicht näher untersucht; es ist möglich, daß sich Fe mit den SH-Gruppen des Globins verbindet wie bei Cystein[19]).

III. Reduziertes Globin.

a) Darstellung von reduziertem Globin.

Nach H. Wu[12]) wurden 200 ccm gewaschenes und cytolisiertes Ochsenblut mit 4 g Kaliumferricyanid zu Methämoglobin oxydiert, 80 Stunden gegen fließendes Wasser bei 0° dialysiert und mit Aluminiumhydroxyd kräftig geschüttelt. Aluminiumhydroxyd reißt Stromata und letzte Spuren Ferricyanid und Ferrocyanid mit; es wurde abzentrifugiert. Die Lösung war 7 %ig in Bezug auf Methämoglobin und wurde auf eine 4 %ige verdünnt. Die Spaltung wurde bei 0° vorgenommen. 80 ccm der Lösung wurden mit 580 ccm Äther-Alkohol (130 ccm Alkohol, 450 ccm Äther) und 40 ccm $\frac{n}{5}$ HCl eine halbe Minute geschüttelt (alle Lösungen und Gefäße waren auf 0° abgekühlt). Die untere, schwach gelb gefärbte Phase wurde mit 300 ccm H_2O (ebenfalls bei 0°) verdünnt und mit 40 ccm $\frac{n}{5}$ NaOH neutralisiert. Von etwa ausgefallenem denaturiertem Globin wurde abfiltriert. Die Lösung wurde im Gaede-Straub-Apparat[20]) eingedampft und mit 200 ccm H_2O das Globin aufgenommen. Von nicht gelöstem, denaturiertem Globin wurde durch Filtrieren getrennt. Das Filtrat war in Bezug auf Globin 2,23 %ig. Durch die Globinlösung, die mit einem Tropfen Oktylalkohol und etwas Quecksilber versetzt war, wurde 10 Minuten Schwefelwasserstoff durchgeleitet; dann wurde der gelöste Schwefelwasserstoff durch Evakuieren entfernt. Bleinitrat rief in der Lösung keine Färbung hervor.

Darstellung aus kristallisiertem Meerschweinchenhämoglobin. Meerschweinchenhämoglobin-Kristalle wurden in $\frac{n}{150}$ NaOH bis zur Sättigung gelöst und durch die Lösung Kohlenoxyd geleitet. Bei 0° wurden 40 ccm Lösung mit 40 ccm $\frac{n}{5}$ HCl und 580 ccm Äther-Alkohol (130 ccm Alkohol, 450 ccm Äther) eine halbe Minute im Scheidetrichter geschüttelt, mit 300 ccm Wasser die wässerige Phase verdünnt und mit 39 ccm $\frac{n}{5}$ NaOH neutralisiert. Der in der Globinlösung gelöste Äther wurde sofort im Vakuum-Exsikkator über H_2SO_4 entfernt, die Lösung bei 0° über H_2SO_4 im Vakuum-Exsikkator eingeengt. Die eingeengte Globinlösung wurde zum Teil mit Aluminiumhydroxyd (halbes Volumen) geschüttelt. Sie war danach fast farblos. Zur Entfernung von NaCl und Alkohol wurde 12 Stunden gegen fließendes Wasser dialysiert. Der Gehalt der entfärbten und dialysierten Lösung an Globin war 0,72 %.

b) Oxydation des Globins durch Kaliumferricyanid.

Reduziertes Globin wurde sofort nach der Bildung in $\frac{m}{10}$ Borat p_H = 9.5 mit Kaliumferricyanid 30 Minuten geschüttelt. Das Globin wurde dann durch Wolframsäure gefällt, und das Ferricyanid und Ferrocyanid durch Titration bestimmt.

1. Versuch mit Globin nach H. Wu, durch Schwefelwasserstoff reduziert.

6 ccm einer 2,23 %igen Globinlösung wurden mit 3 ccm $\frac{m}{3}$ Borat p_H = 9.5 und 2 ccm H_2O + 14,7 mg K_3FeCy_6 30 Minuten geschüttelt. Das Globin wurde gefällt; im Filtrat Ferricyanid und Ferrocyanid bestimmt.

Für 6 ccm Globinlösung	Verbrauch an $\frac{n}{500}$ Thiosulfat	Menge in cmm
Ferricyanid	13,24 ccm	598
Gesamtcyanid	22,1 „	990
Ferrocyanid		392

Die Globinlösung entspricht 184 cmm, die sie in Form von Hämoglobin binden könnte.

Es werden auf 1 Globin 2 K_3FeCy_6 — Äquivalente verbraucht. Als Kontrolle wurde dasselbe Globin, nicht durch H_2S reduziert, mit Borat und Ferricyanid geschüttelt. Es ergab sich für Ferricyanid in 3 ccm Globinlösung 11,00 ccm $\frac{n}{500}$ Thiosulfatverbrauch, für 6 ccm also 22,0 ccm $\frac{n}{500}$ Thiosulfat. Es wurde kein Ferricyanid verbraucht.

2. Versuch mit Globin aus Hämoglobin-Kristallen.

7 ccm einer 0.636 %igen Globinlösung wurden mit 1 ccm $\frac{m}{1}$ Borat p_H 9.5 und 0,2 ccm H_2O + 4 mg K_3FeCy_6 30 Minuten geschüttelt. Das Globin wurde gefällt. Im Filtrat ergab sich für Ferricyanid:

für 7 ccm Globin-Lösung 3,42 ccm $\frac{n}{500}$ Thiosulfatverbrauch,

für 7 ccm Globinlösung wurde an Gesamtcyanid 6,04 ccm Thiosulfatverbrauch gefunden. Verbraucht wurden also an Ferricyanid in 7 ccm Globinlösung 118,5 cmm, in 1 ccm Globinlösung 17 cmm K_3FeCy_6. Da 1 ccm Globinlösung 6,36 mg Globin = 8,75 cmm entspricht, so reduziert 1 Globin 2 K_3FeCy_6-Äquivalente.

c) Oxydation des Globins durch Sauerstoff.

Reduziertes Globin in $\frac{m}{10}$ Borat p_H = 9.5 wird durch Luftsauerstoff langsam oxydiert. Der Sauerstoffverbrauch wurde manometrisch gemessen. Eine Kontrolle mit oxydiertem Globin gab keinen Sauerstoffverbrauch.

Protokoll II.

Temperatur: 20° Gasraum: Luft

Hauptraum:	1 ccm 0,3 mol. Borat p_H = 9.5 2 ccm 2,23 %iger Globinlösung (gleich 62 cmm)
nach 2 Stunden	— 2,8 cmm
„ 5 „	— 8,4 „
„ 8 „	— 12,6 „
„ 10 „	— 15,4 „
„ 17 „	— 16,2 „

16.2 cmm entsprechen 64,8 cmm H-Äquivalenten. Das Globin ist nach 17 Stunden durch Sauerstoff oxydiert.

d) Oxydation des Globins durch Hämin; Bildung von Hämoglobin.

Reduziertes Globin wird mit Hämin zu Methämoglobin gekoppelt, in dem der Globinbestandteil reduziert ist. Unter Kohlenoxyd oxydiert das dreiwertige Eisen des Methämoglobins das Globin; es entsteht also Hämoglobin, in dem der Globinbestandteil oxydiert ist. Die Kohlenoxydaufnahme durch Bildung von Kohlenoxyd-Hämoglobin wurde manometrisch gemessen. Eine Kontrolle mit oxydiertem Globin gab keine Kohlenoxydaufnahme.

Protokoll III.

Temperatur: 20° Gasraum: CO

Hauptraum:	1 ccm 0,3 mol. Borat $p_H = 9.5$ 2 ccm 2,23%iger Globinlösung (gleich 62 cmm)
Birne:	2 mg Hämin in 0,4 ccm $\frac{n}{20}$ NaOH
Nach dem Einkippen des Hämins: Stunden	cmm CO
1	— 8,5
2	— 11,2
3	— 15,1
4	— 15,8
8	— 24,3

Zur Prüfung der gebildeten Menge Hämoglobin wurde die Kapazität durch Zugabe von 0,2 ccm 34%iger Ferricyanid-Lösung bestimmt. Unter Kohlenoxyd wurde in die geleerte Birne des Versuchsgefäßes 0,2 ccm 34%iger Ferricyanidlösung nachgefüllt und nach Temperaturausgleich in den Hauptraum gekippt. Die Kapazitätsbestimmung ergab + 24,5 cmm CO.

Die gesamte Kohlenoxydaufnahme rührte also von der Bildung von Kohlenoxydhämoglobin her.

e) Reversibles Oxyhämoglobin.

Globin wurde mit Hämin gekoppelt, das entstandene Methämoglobin nach O. Warburg und E. Negelein[21]) unter Argon mit Cystein reduziert. Nach 24 Stunden wurde mit Sauerstoff geschüttelt und, als nach 90 Minuten die Oxydation des unverbrauchten Cystein beendet war, die Kapazität mit Ferricyanid bestimmt. Als Kontrolle diente mit Hydrosulfit in Kohlenoxyd reduziertes Methämoglobin. Erhalten wurde 90%iges bzw. 87%iges reversibles Oxyhämoglobin.

Protokoll IV.

Temperatur: 20°

	Kontrolle	Gefäß I	Gefäß II
Hauptraum:	0,3 ccm $\frac{m}{1}$ Borat $p_H = 9.5$ 3 ccm 2,23%iger Globinlösung 1 mg Hämin 0,2 ccm $\frac{n}{20}$ NaOH	→	→
	1 mg Hydrosulfit in 0,1 ccm $\frac{n}{20}$ NaOH	3 mg Cysteinchlorhydrat in 0,2 ccm $\frac{m}{10}$ Borat $p_H = 9.5$	→
Birne:	0,2 ccm 34%iger Ferricyanidlösung	→	→
Gasraum:	100% CO	100% O_2	→

Nach dem Einkippen des Ferricyanids: Minuten	cmm CO	cmm O_2	cmm O_2
5	+32,1	+30,5	+28,8
10	+34,8	+31,1	+30,1
20	+34,8	+31,1	+30,1

f) Nitroprussidnatriumreaktion auf SH-Gruppen im Globin.

Mit reduziertem Globin, durch Schwefelwasserstoff reduziert oder aus Hämoglobinkristallen dargestellt, wurde die Nitroprussidnatriumreaktion vorgenommen. 2—3 Tropfen einer 5%igen, frisch bereiteten Nitroprussidnatriumlösung wurden zu der mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung versetzten Globinlösung gegeben. Zusatz von einigen Tropfen 25%iger Ammoniaklösung bewirkte in beiden Fällen Rotfärbung. Der Versuch verlief negativ bei oxydiertem Globin.

g) Bestimmung des Schwefels im Hämoglobin.

Meerschweinchenhämoglobin-Kristalle wurden in Wasser suspendiert, 0,2 ccm der Suspension im Hauptraum eines Manometergefäßes gewogen, mit 2 ccm $\frac{m}{10}$ Borat $p_H = 9.5$ gelöst und mit Ferricyanid in Kohlenoxyd die Kapazität bestimmt.

Gewicht der 0,2 ccm Suspension: 206,5 mg.

Kapazitätsbestimmung: 59,2 cmm CO.

100 mg Suspension entsprechen 28,7 cmm CO = 0,0717 mg Fe.

1832,30 mg Suspension wurden in ein Wägeglas eingewogen, 12 Stunden bei Zimmertemperatur über KOH im Vakuum-Exsikkator getrocknet.

Trockensubstanz: 513,54 mg = 28,03 % der Suspension.

Schwefelbestimmung durch Verbrennen im Sauerstoffstrom nach F. Pregl[22]).

1. 98,073 mg Trockensubstanz ergeben 4,196 mg $BaSO_4$; S = 0,588 %,
2. 74,916 mg Trockensubstanz ergeben 3,239 mg $BaSO_4$; S = 0,594 %

Schwefelgehalt im Mittel: 0,591 % der Trockensubstanz.
100 mg Suspension enthalten 0,0717 mg Eisen.
100 mg Trockensubstanz enthalten 0,255 mg Eisen
Eisengehalt: 0,255 % der Trockensubstanz.
255 g Eisen sind 4,66 Mol.
591 g Schwefel sind 18,45 Mol.
Auf 1 Mol. Eisen kommen im Hämoglobin 4 Mole Schwefel.

IV. Bestimmung des Gleichgewichtes.

$$K = k_{co} \cdot \frac{HbCO \cdot K_3FeCy_6}{HbOH \cdot K_4FeCy_6 \cdot p_{co}}$$

a) Bestimmung von Kohlenoxydhämoglobin und Methämoglobin manometrisch.

Freies Hämoglobin wird durch Ferricyanid zu Methämoglobin oxydiert; es dissoziiert entsprechend Kohlenoxydhämoglobin in freies Hämoglobin und Kohlenoxyd. Die entstandene Kohlenoxydmenge ist also gleich dem verbrauchten Kohlenoxydhämoglobin und dem entstandenen Methämoglobin. Damit man aus den Versuchen ohne umständliche Rechnung die Mengen der Reaktionsteilnehmer ersieht, werden für die manometrischen und die damit verbundenen titrimetrischen Messungen die Konzentrationen in $\frac{cmm}{ccm}$ angegeben. Dabei gebe ich für Hämoglobin und Methämoglobin die Anzahl cmm Kohlenoxyd an, die es binden, bzw. bei der Reduktion aufnehmen kann, für Ferricyanid und Ferrocyanid setze ich 1 Grammol gleich $22\,400 \cdot 10^3$ cmm.

Es wird die Reaktion bei konstantem Salzgehalt gemessen.

Protokoll V.

Temperatur: t = 20°; Meerschweinchenhämoglobin in $\frac{m}{10}$ Borat $p_H = 9.5$.

Anfangskonzentration des Kohlenoxydhämoglobins:

in Gefäß I: 76,9 $\frac{\text{cmm}}{\text{ccm}}$

in Gefäß II: 115,3 $\frac{\text{cmm}}{\text{ccm}}$

in Gefäß III: 153,8 $\frac{\text{cmm}}{\text{ccm}}$

Anfangskonzentration des Ferricyanids in allen drei Gefäßen: 448 $\frac{\text{cmm}}{\text{ccm}}$.

	Gefäß I	Gefäß II	Gefäß III
Hauptraum:	1 ccm Hämoglobinlösung 1,5 ccm $\frac{m}{10}$ Borat $p_H = 9.5$	1,5 ccm Hämoglobinlösung 1 ccm $\frac{m}{10}$ Borat $p_H = 9.5$	2 ccm Hämoglobinlösung 0,5 ccm $\frac{m}{10}$ Borat $p_H = 9.5$
Birne:	0,18 ccm H_2O + 17,62 mg K_3FeCy_6	→	→
Gasraum:	100% CO	→	→
Nach dem Einkippen des Ferricyanids Minuten	cmm CO	cmm CO	cmm CO
10	+ 134,5	+ 175,5	+ 226,2
20	+ 164,0	+ 214,2	+ 273,0
30	+ 175,0	+ 228,0	+ 284,0
60	+ 186,8	+ 243,8	+ 290,0
90	+ 189,7	+ 254,3	+ 290,0
105	+ 189,7	+ 255,0	+ 290,0
120	+ 189,7	+ 255,0	+ 290,0

Gleichgewichtskonzentration des Kohlenoxydhämoglobins

in Gefäß I: 6 $\frac{\text{cmm}}{\text{ccm}}$; in Gefäß II: 20,1 $\frac{\text{cmm}}{\text{ccm}}$;

in Gefäß III: 45,6 $\frac{\text{cmm}}{\text{ccm}}$.

Gleichgewichtskonzentration des Methämoglobins

in Gefäß I: 70,9 $\frac{\text{cmm}}{\text{ccm}}$; in Gefäß II: 95,2 $\frac{\text{cmm}}{\text{ccm}}$;

in Gefäß III: 108,2 $\frac{\text{cmm}}{\text{ccm}}$.

b) Bestimmung von Ferricyanid und Ferrocyanid durch Titration.

Nach Beendigung des manometrischen Versuches wurden unter Kohlenoxyddurchleiten je 2 ccm Lösung den Manometergefäßen entnommen und sofort in eine mit Kohlenoxyd gesättigte Lösung von 20 ccm H_2O, 3 ccm 10%igem Natriumwolframat und 2 ccm $\frac{n}{1}$ H_2SO_4 gebracht. Das Hämoglobin und Methämoglobin fiel vollkommen aus und wurde abzentrifugiert, der Niederschlag noch einmal mit $\frac{n}{10}$ H_2SO_4 gewaschen. Die eine Hälfte der vereinigten Flüssigkeitsmengen wurde zur Titration von Ferricyanid, die andere zur Titration des Gesamtcyanids verwandt. Die Titration des Ferricyanids erfolgte nach Zugabe eines Überschusses an Kaliumjodid und Zinksulfat. Das ausgeschiedene Jod wurde unter Stärkezusatz mit $\frac{n}{500}$ Thiosulfat titriert. Für die Bestimmung des Ferrocyanids erwies sich folgende Methode als sehr geeignet:

Es wurde das Gesamtcyanid als Ferricyanid bestimmt. In schwach essigsaurer Lösung wurde mit einem Überschuß von Kaliumpermanganat alles Eisencyanid zu Ferricyanid oxydiert. Das überschüssige Kaliumpermanganat wurde durch Kaliumjodid beseitigt. das ausgeschiedene Jod mit Thiosulfat wegtitriert. Jetzt wurde die Lösung stark sauer gemacht, und Zinksulfat im Überschuß zugesetzt. Das durch Ferricyanid in Freiheit gesetzte Jod wurde mit $\frac{n}{500}$ Thiosulfat bestimmt. Die zugesetzten Ferri- und Ferrocyanidmengen wurden stets vollständig als Gesamtcyanid wiedergefunden; in diesem Fall ergab die Gesamtcyanidbestimmung einen Verbrauch an $\frac{n}{500}$ Thiosulfat für 1 ccm Versuchslösung: 10 ccm Thiosulfat; das ist eine Gesamtcyanidkonzentration von 448 $\frac{cmm}{ccm}$.

Für Ferricyanid im Gleichgewicht ergaben sich in diesem Versuch folgende Werte:

Für 1 ccm Versuchslösung:	Verbrauch an $\frac{n}{500}$ Thiosulfat	Ferricyanid Konzentration
in Gefäß I	5,23 ccm $\frac{n}{500}$ Thiosulfat	234 $\frac{cmm}{ccm}$
in Gefäß II	3,20 ccm $\frac{n}{500}$ Thiosulfat	134,5 $\frac{cmm}{ccm}$
in Gefäß III	2,29 ccm $\frac{n}{500}$ Thiosulfat	102,5 $\frac{cmm}{ccm}$

Die Ferrocyanidkonzentration ist also im Gleichgewicht in Gefäß I: 214 $\frac{cmm}{ccm}$; in Gefäß II: 304,5 $\frac{cmm}{ccm}$; in Gefäß III: 345,5 $\frac{cmm}{ccm}$.

Da P_{CO} gleich 10 000 mm Brodie ist, ergibt sich für das Gleichgewicht:

in Gefäß I: $K = 3{,}7 \cdot 10^{-7}$,
in Gefäß II: $K = 4{,}0 \cdot 10^{-7}$,
in Gefäß III: $K = 5{,}0 \cdot 10^{-7}$.

Bestimmung der Gleichgewichtskonstante bei konstantem Salzgehalt.

1. Versuchstabelle:

Versuch:	1	2	3	4	5	6
Anfangskonzentration des Ferricyanids	448	448	448	448	448	448
Anfangskonzentration des Kohlenoxydhämoglobins	76,9	115,3	153,8	73,5	110	147
Gleichgewichtskonzentration des Kohlenoxydhämoglobins	6	20,1	45,6	6,6	18,7	39,5
Gleichgewichtskonzentration des Methämoglobins	70,9	95,2	108,2	66,9	91,5	107,5
Gleichgewichtskonzentration des Ferricyanids	234	143,5	102,5	220	146,5	88
Gleichgewichtskonzentration des Ferrocyanids	214	304,5	345,5	228	301,5	360
Gleichgewichtskonstante $K = k_{CO} \frac{HbCO \cdot K_3FeCy_6}{HbOH \cdot K_4FeCy_6 \cdot p_{CO}}$	$3{,}7 \cdot 10^{-7}$	$4{,}0 \cdot 10^{-7}$	$5{,}0 \cdot 10^{-7}$	$3{,}8 \cdot 10^{-7}$	$4{,}0 \cdot 10^{-7}$	$3{,}6 \cdot 10^{-7}$

Die Konzentrationen sind in $\frac{cmm}{ccm}$ angegeben. Für die Gleichgewichtskonstante ist der Mittelwert: $K = 4 \cdot 10^{-7}$.

Die Reaktion Methämoglobin und Ferrocyanid läuft zu demselben Gleichgewicht. 1. Wird Oxyhämoglobin in Luft mit Ferricyanid zusammengebracht, so wird es fast vollständig in Methämoglobin umgewandelt. Jetzt wird im Thermostaten in den Manometern die Luft durch Kohlenoxyd verdrängt, ohne die Manometer zu schütteln, und 5 Minuten zum Temperaturausgleich gewartet. Dann erst wird geschüttelt und die Kohlenoxydaufnahme gemessen.

Zu Abbildung 2:

Kurve I zeigt die Kohlenoxydaufnahme, ausgegangen von Methämoglobin und Ferrocyanid, Kurve II die Kohlenoxydentwicklung, ausgegangen von Kohlenoxydhämoglobin und Ferricyanid. Die Hämoglobin- und Ferricyanidkonzentrationen sind in beiden Versuchen dieselben: Anfangskonzentration an Kohlenoxydhämoglobin bzw. Oxyhämoglobin: 93 $\frac{\text{cmm}}{\text{ccm}}$; Anfangskonzentration des Ferricyanids: 280 $\frac{\text{cmm}}{\text{ccm}}$. Näheres zu der Abbildung in Protokoll VI.

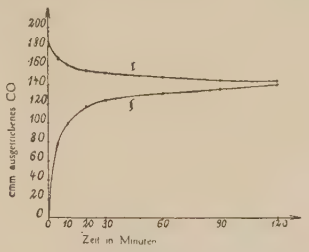

Abbildung 2

Protokoll VI.

Temperatur: t = 20°

	Gefäß I	Gefäß II
Hauptraum:	2 ccm Hämoglobinlösung in $\frac{m}{10}$ Borat $p_H = 9.5$	——→
Birne:	0,15 ccm H_2O + 8,82 mg K_3FeCy_6	——→
Gasraum:	Luft	100% CO

Minuten	zur Zeit t = 0 Ferricyanid zugekippt cmm O_2	
10	+ 196,0	
20	+ 196,0	

Minuten	CO durch das Manometer geleitet; zur Zeit t = 0 geschüttelt und gemessen ccm CO	zur Zeit t = 0 Ferricyanid zugekippt cmm CO
5	— 26,8	+ 77,5
10	— 32,8	+ 101,2
20	— 38,7	+ 117,5
30	— 41,7	+ 123,0
60	— 47,7	+ 132,3
90	— 50,7	+ 137,0
120	— 50,7	+ 139,5

2. Zu präparativ dargestelltem Methämoglobin wird Ferrocyanid unter Kohlenoxyd zugesetzt und die Reaktionsteilnehmer im Gleichgewicht gemessen.

Anfangskonzentrationen:

Methämoglobinkonzentration: 82,2 $\frac{cmm}{ccm}$

Ferrocyanidkonzentration: 232 $\frac{cmm}{ccm}$

Gleichgewichtskonzentrationen:

Ferricyanidkonzentration: 42,7 $\frac{cmm}{ccm}$

Kohlenoxydhämoglobinkonzentration: 26,4 $\frac{cmm}{ccm}$

Ferrocyanidkonzentration: 189,0 $\frac{cmm}{ccm}$

Methämoglobinkonzentration: 55,8 $\frac{cmm}{ccm}$

Die Gleichgewichtskonstante beträgt:

$$K \quad \frac{HbCO \cdot K_3FeCy_6}{HbOH \cdot K_4FeCy_6 \cdot p_{CO}} \cdot k_{CO} \quad - 10{,}75 \cdot 10^{-6} \cdot k_{CO} \quad 4{,}3 \cdot 10^{-7}.$$

c) Aufnahme des entwickelten Kohlenoxyd bei kleinen Ferricyanidkonzentrationen.

Werden zu Kohlenoxydhämoglobinlösungen Ferricyanidmengen zugesetzt, die nicht ausreichen, um das Hämineisen und das Globin zu oxydieren, so tritt nach Verbrauch des Ferricyanids eine Wiederaufnahme von Kohlenoxyd auf, die davon herrührt, daß noch reduziertes Globin durch das dreiwertige Eisen des Methämoglobins oxy-

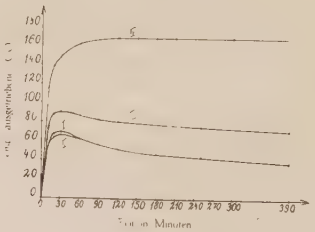

Abbildung 3

diert wird. Reduktion des Methämoglobin durch Verunreinigungen liegt nicht vor; es wurden Versuche mit dreimal umkristallisiertem Hämoglobin unternommen, bei denen die Kohlenoxydaufnahme genau so verlief, wie bei nicht umkristallisiertem Hämoglobin.

Zu Abbildung 3:

Kurve I: Versuch mit umkristallisiertem Meerschweinchenhämoglobin in $\frac{m}{10}$ Borat $p_H = 9.5$.

Anfangskonzentration des Kohlenoxydhämoglobins: 91 $\frac{cmm}{ccm}$

Anfangskonzentration des Ferricyanid: 95 $\frac{cmm}{ccm}$

Kurve II und III: Versuch mit nicht umkristallisiertem Hämoglobin in $\frac{m}{10}$ Borat $p_H = 9.5$.

Anfangskonzentration des Kohlenoxyhämoglobins in II u. III: 88 $\frac{cmm}{ccm}$

Anfangskonzentration des Ferricyanid in II: 95 $\frac{cmm}{ccm}$

Anfangskonzentration des Ferricyanid in III: 186 $\frac{cmm}{ccm}$

Kurve IV: Vergleichsversuch mit ausreichendem Ferricyanid:

Anfangskonzentration des Kohlenoxydhämoglobins: 80 $\frac{cmm}{ccm}$

Anfangskonzentration des Ferricyanid: 340 $\frac{cmm}{ccm}$

Ist bei dem Versuch ein Überschuß an Blausäure zugegen, so wird das gebildete Methämoglobin in Cyanmethämoglobin umgewandelt. Eine Wiederaufnahme von Kohlenoxyd wurde nicht gemessen.

d) Wirkung von Neutralsalzen auf das Gleichgewicht.

Neutralsalze, auch Ferricyanid und Ferrocyanid, wirken auf das Gleichgewicht der Reaktion: $K \quad k_{co} \cdot \frac{HbCO \cdot K_3FeCy_6}{HbOH \cdot K_4FeCy_6 \cdot p_{co}}$ ein. Die Oxydation zu Methämoglobin schreitet weiter; die Wirkung der einzelnen Salze ist verschieden groß.

Versuch I:

Wirkung verschiedener KCl-Konzentrationen auf die Reaktion.

Anfangskonzentration des Kohlenoxydhämoglobins: 23 $\frac{cmm}{ccm}$

Anfangskonzentration des Ferricyanid: 85 $\frac{cmm}{ccm}$

Zu Abbildung 4:
Kurve I: ohne Zusatz von KCl gemessen.
Kurve II: in $\frac{n}{5}$ KCl gemessen.
Kurve III: in $\frac{n}{1}$ KCl gemessen.

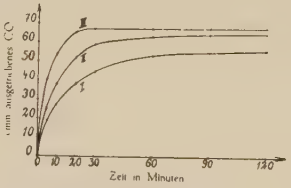

Abbildung 4

Protokoll VII.

Temperatur: t = 20°

	Gefäß I	Gefäß II	Gefäß III
Hauptraum:	3 ccm Hämoglobinlösung in $\frac{m}{10}$ Borat	→	→
	$p_H = 9{,}5$	+ 50 mg KCl	+ 250 mg KCl
Birne:	0,2 ccm H_2O + 4 mg K_3FeCy_6	→	→
Gasraum:	100% CO	→	→
Nach Einkippen des Ferricyanids: Minuten	cmm CO	cmm CO	cmm CO
5	+ 18,6	+ 24,3	+ 40,3
10	+ 27,1	+ 37,8	+ 54,2
20	+ 38,6	+ 52,7	+ 65,4
30	+ 45,0	+ 58,7	+ 66,7
60	+ 52,9	+ 63,5	+ 67,4
90	+ 55,7	+ 64,7	+ 67,4
120	+ 55,7	+ 64,7	+ 67,4

Versuch II:

Wirkung von Natriumsulfat und Kaliumsulfat auf die Reaktion.

Anfangskonzentration des Kohlenoxydhämoglobins: 56,5 $\frac{cmm}{ccm}$

Anfangskonzentration des Ferricyanid: 123,5 $\frac{cmm}{ccm}$

Zu Abbildung 5:
Kurve I: ohne Zusatz von Salz gemessen.

Kurve II: in $\frac{n}{1}$ K_2SO gemessen.

Kurve III: in $\frac{n}{1}$ Na_2SO gemessen.

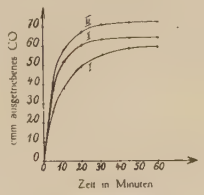

Abbildung 5

e) Einfluß des Kohlenoxyddruckes auf das Gleichgewicht.

1. Einfluß des Kohlenoxyds auf die Reaktionsgeschwindigkeit. Die Reaktionsgeschwindigkeit der Hinreaktion wird durch verringerten Kohlenoxyddruck beschleunigt.

Zu Abbildung 6:

Anfangskonzentration des Kohlenoxydhämoglobins: 28,9 $\frac{cmm}{ccm}$

Anfangskonzentration des Ferricyanids: 30,9 $\frac{cmm}{ccm}$

Kurve I: gemessen in 100 % Kohlenoxyd.

Kurve II: gemessen in 20 % Kohlenoxyd in Argon.

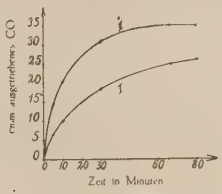

Abbildung 6

Temperatur: t = 20°; Meerschweinchenhämoglobin in $\frac{m}{10}$ Borat $p_H = 9.5$.

Die Geschwindigkeit der Rückreaktion ist unabhängig vom Kohlenoxyddruck. Oxyhämoglobin wurde im Manometergefäß mit einem kleinen Überschuß an Ferricyanid zu Methämoglobin oxydiert. Als keine Drucke mehr auftraten, wurde 100 % Kohlenoxyd bzw. 50 % Kohlenoxyd in Argon durch die Manometer geleitet und die Kohlenoxydaufnahme gemessen.

Zu Abbildung 7:

Anfangskonzentration des Hämoglobins: 93 $\frac{\text{cmm}}{\text{ccm}}$

Anfangskonzentration des Ferricyanid: 186,5 $\frac{\text{cmm}}{\text{ccm}}$

Kurve I: gemessen in 100 % Kohlenoxyd.
Kurve II: gemessen in 50 % Kohlenoxyd in Argon.
Näheres in Protokoll VIII.

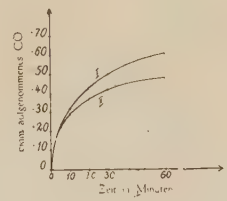

Abbildung 7

Protokoll VIII.

Temperatur: t = 20°

	Gefäß I	Gefäß II
Hauptraum:	2 ccm Hämoglobinlösung in $\frac{m}{10}$ Borat $p_H = 9.5$	→
Birne:	0,15 ccm H_2O + 5,88 mg K_3FeCy_6	→
Gasraum:	Luft	Luft
Minuten	zur Zeit t = 0 Ferricyanid zugekippt cmm O_2	→ cmm O_2
10	+ 192,5	+ 189,5
20	+ 192,5	+ 189,5
Nach Durchleiten des Gases: Minuten	100 % CO durch das Manometer geleitet cmm CO	50 % CO in Argon durch das Manometer geleitet cmm CO
5	— 22,4	— 21,5
10	— 32,0	— 29,3
20	— 43,2	— 37,1
30	— 50,0	— 42,2
60	— 61,0	— 47,9

2. Einfluß des Kohlenoxyds auf das Gleichgewicht.

Es wurde geprüft, ob die Gleichgewichtsgleichung:

$$K = k_{co} \cdot \frac{HbCO \cdot K_3FeCy_6}{HbOH \cdot K_4FeCy_6 \cdot p_{co}}$$

bei variiertem Kohlenoxyddruck zutrifft. Um die Rückreaktion zu vergrößern, d. h. um ein Gleichgewicht mit größerer Genauigkeit bestimmen zu können, wurde eine große Menge Ferrocyanid mit dem Ferricyanid zur Hämoglobinlösung zugesetzt.

Protokoll IX.

Temperatur: t = 20°; Tierart: Meerschweinchenhämoglobin.

Anfangskonzentration des Kohlenoxydhämoglobins: 83,8 cmm/ccm

Anfangskonzentration des Ferricyanid: 340,5 cmm/ccm

Anfangskonzentration des Ferrocyanid: 1065 cmm/ccm

Barometerstand: 760 mm Hg = 10 000 mm Brodie.

Die Wasserdampftension bei 20°: e = 17 mm Hg = 224 mm Brodie.

	Gefäß I	Gefäß II	Gefäß III
Hauptraum:	2 ccm Hämoglobinlösung in $\frac{m}{10}$ Borat $p_H = 9.5$	→	→
Birne:	0,35 ccm H_2O + 11,76 mg K_3FeCy_6 + 47,3 mg K_4FeCy_6	→	→
Gasraum:	100% CO	30% CO in Argon	10% CO in Argon
Nach Einkippen des Birneninhalts: Minuten	cmm CO	cmm CO	cmm CO
5	+ 95,2	+ 114,6	+ 120,8
10	+ 116,0	+ 143,0	+ 154,5
20	+ 129,5	+ 162,0	+ 178,2
30	+ 135,5	+ 168,5	+ 185,3
60	+ 140,5	+ 171,5	+ 186,0
90	+ 140,5	+ 171,5	+ 186,0
120	+ 140,5	+ 171,5	+ 186,0

Die Hämoglobinkonzentration beträgt im Gleichgewicht:

in Gefäß I: 24 $\frac{cmm}{ccm}$; in Gefäß II: 10,85 $\frac{cmm}{ccm}$;

in Gefäß III: 4,67 $\frac{cmm}{ccm}$.

Die Methämoglobinkonzentration beträgt im Gleichgewicht:

in Gefäß I: 59,8 $\frac{cmm}{ccm}$; in Gefäß II: 73 $\frac{cmm}{ccm}$;

in Gefäß III: 79,1 $\frac{cmm}{ccm}$.

Ferricyanid und Ferrocyanid wurden wie früher bestimmt. Für Ferricyanid wurde gefunden:

Für 1 ccm Versuchslösung:	Verbrauch an $\frac{n}{500}$ Thiosulfat	Ferricyanid-konzentration
in Gefäß I	2,66 ccm $\frac{n}{500}$ Thiosulfat	119 $\frac{cmm}{ccm}$
in Gefäß II	2,56 ccm $\frac{n}{500}$ Thiosulfat	114,5 $\frac{cmm}{ccm}$
in Gefäß III	2,40 ccm $\frac{n}{500}$ Thiosulfat	107,5 $\frac{cmm}{ccm}$

Für Gesamtcyanid wurde gefunden:

für 1 ccm Versuchslösung:	Verbrauch an $\frac{n}{500}$ Thiosulfat	Gesamtcyanid-konzentration
in Gefäß I	31,50 ccm $\frac{n}{500}$ Thiosulfat	1410 $\frac{cmm}{ccm}$
in Gefäß II	31,35 ccm $\frac{n}{500}$ Thiosulfat	1405 $\frac{cmm}{ccm}$
in Gefäß III	31,40 ccm $\frac{n}{500}$ Thiosulfat	1407 $\frac{cmm}{ccm}$

also die Konzentrationen des Ferrocyanid im Gleichgewicht:

in Gefäß I: 1286,5 $\frac{cmm}{ccm}$; in Gefäß II: 1291,0 $\frac{cmm}{ccm}$;

in Gefäß III: 1298 $\frac{cmm}{ccm}$.

Der Kohlenoxyddruck p_{co} setzt sich folgendermaßen zusammen:

p_{co} = (Atmosphärendruck weniger Wasserdampftension e) $\cdot \frac{\text{Vol}^0/_0\text{CO}}{100}$ + h (Menge ausgetriebenen Kohlenoxyds in mm).

in Gefäß I: $p_{co} = (10\,000 - 224) \cdot \frac{100}{100} + 100{,}5 = 9876$ mm Brodie

In Gefäß II: $p_{co} = (10\,000 - 224) \cdot \frac{30}{100} + 124{,}5 = 3055$ mm Brodie

In Gefäß III: $p_{co} = (10\,000 - 224) \cdot \frac{10}{100} + 137{,}5 = 1115$ mm Brodie.

Für das Gleichgewicht ergibt sich:

In Gefäß I: $K = k_{co} \cdot \frac{HbCO \cdot K_3FeCy_6}{HbOH \cdot K_4FeCy_6 \cdot p_{co}} = 1{,}52 \cdot 10^7$

In Gefäß II: $K = k_{co} \cdot \frac{HbCO \cdot K_3FeCy_6}{HbOH \cdot K_4FeCy_6 \cdot p_{co}} = 1{,}72 \cdot 10^7$

In Gefäß III: $K = k_{co} \cdot \frac{HbCO \cdot K_3FeCy_6}{HbOH \cdot K_4FeCy_6 \cdot p_{co}} = 1{,}76 \cdot 10^7$

Die Abweichung des Wertes der Konstanten von dem früherer Versuche ist auf die Salzwirkung, hervorgerufen durch die große Menge Ferrocyanid, zurückzuführen; aus dem Versuch geht hervor, daß die Gleichgewichtsgleichung für den Kohlenoxyddruck von 1000 mm Brodie bis 10 000 mm Brodie zutrifft.

V. Potentiometrische Messung des Gleichgewichts:

$$K = k_{co} \cdot \frac{HbCO \cdot K_3FeCy_6}{HbOH \cdot K_4FeCy_6 \cdot p_{co}}$$

Gemessen wurde in $\frac{m}{10}$ Borat $p_H = 9.5$ gegen eine Kalomelelektrode in gesättigtem Kaliumchlorid mit blanker Platinelektrode. Eine Standard-Acetat-Lösung von $p_H = 4{,}62$ zeigte 0,519 V bei 20° (p_H-Bestimmung mit platinierter Elektrode). Zu Kontrollmessungen diente gewöhnlich eine Standardlösung von $\frac{m}{100}$ K_3FeCy_6 — $\frac{m}{100}$ K_4FeCy_6 in $\frac{m}{1}$ KCl, deren Potential von L. Michaelis und C. V. Smythe[23]) bestimmt ist. Diese hatte bei 20° ein Potential von 0,231 V gegen die Kalomelelektrode.

Ausführung eines Versuches.

4 ccm Meerschweinchen-Hämoglobin-Lösung in $\frac{m}{10}$ Borat $p_H = 9.5$ wurden im Elektrodengefäß mit Kohlenoxyd gesättigt, unter Kohlen-

oxyd-Durchleiten 0,3 ccm H_2O + 26,43 mg K_3FeCy_6 zugefügt, das Gefäß geschlossen und eine Stunde im Dunkeln geschüttelt.

Anfangskonzentration des Ferricyanid: 419 $\frac{cmm}{ccm}$

Anfangskonzentration des Kohlenoxydhämoglobins: 69,2 $\frac{cmm}{ccm}$

Als Potential wurde gemessen: 0,1735 V.
nach weiteren 30 Minuten langem Schütteln: 0,1734 V.

2 ccm der Lösung wurden unter Kohlenoxyd-Durchleiten dem Gefäß entnommen und sofort mit Wolframsäure das Hämoglobin und Methämoglobin gefällt; in der Flüssigkeit wurde Ferricyanid und Gesamtcyanid bestimmt.

Gefunden wurde für 1 ccm Lösung:

1. für Ferricyanid: 4,83 ccm $\frac{n}{500}$ Thiosulfatverbrauch

   Ferricyanidkonzentration im Gleichgewicht: 216 $\frac{cmm}{ccm}$

2. für Gesamtcyanid: 9,75 ccm $\frac{n}{500}$ Thiosulfatverbrauch

   Gesamtcyanidkonzentration im Gleichgewicht: 436 $\frac{cmm}{ccm}$

also Ferrocyanidkonzentration im Gleichgewicht: 220 $\frac{cmm}{ccm}$

Eine Vergleichslösung von $\frac{m}{100}$ Ferricyanid — $\frac{m}{100}$ Ferrocyanid in $\frac{m}{10}$ Borat p_H 9.5 — im Gasraum Kohlenoxyd — zeigte ein Potential von 0,1801 V. gegen Kalomelelektrode.

In 1 ccm der Versuchslösung wurde Kohlenoxydhämoglobin durch Kapazitätsbestimmung ermittelt;

Kohlenoxydhämoglobinkonzentration im Gleichgewicht: 5,6 $\frac{cmm}{ccm}$

Methämoglobinkonzentration im Gleichgewicht: 63,6 $\frac{cmm}{ccm}$

Die Konzentration an freiem Hämoglobin ist demnach:

$$Hb = \frac{HbCO}{CO} \cdot k_{co} = 2{,}24 \cdot 10^{-5} \frac{cmm}{ccm}$$

hieraus erhalte ich das Potential von Hämoglobin:

$$E = \frac{RT}{nF} \cdot \ln \frac{c_1}{c_2} \left(\frac{Ox}{Red}\right) + E_0 \; ; \; E_0 = E - \frac{RT}{nF} \cdot \ln \frac{c_1}{c_2}$$

$E_0 = 0{,}1735 - 0{,}058 - \log 2\,840\,000$

E_0 = — 0,201 V. gegen Kalomelelektrode
+ 0,049 V. gegen Normal-Wasserstoffelektrode.

Das Oxydationspotential von Hämoglobin-Methämoglobin beträgt für Meerschweinchen-Hämoglobin in $\frac{m}{10}$ Borat $p_H = 9.5$ bei 20° und einer Gesamtcyanidkonzentration von 450 $\frac{cmm}{ccm}$ im Mittel + 0,053 V. gegen Normal-Wasserstoffelektrode.

2. Versuchstabelle:

Versuch:	1	2	3	4	5	6
Anfangskonzentration des Gesamtcyanids	436	450	450	431	255	420
Anfangskonzentration des Ferricyanids	436	450	450	431	255	210
Anfangskonzentration des Ferrocyanids	—	—	—	—	—	210
Anfangskonzentration des Kohlenoxydhämoglobins	69,2	72,7	145,5	138,5	88,5	67,5
Gleichgewichtskonzentration des Kohlenoxydhämoglobins	5,6	4,8	40,8	38,2	41,6	31,7
Gleichgewichtskonzentration des Methämoglobins	63,6	67,9	104,7	100,3	46,9	35,8
Gleichgewichtskonzentration des Ferricyanids	216,0	222,0	104,0	80,3	30,6	43,7
Gleichgewichtskonzentration des Ferrocyanids	220,0	228,0	346,0	350,7	224,4	376,3
Gemessenes Potential E der Versuchslösung in Volt	+0,1735	+0,1830	+0,1450	+0,1427	+0,0960	+0,1193
	gegen Kalomelelektrode					
Gemessenes Potential E der Vergleichslösung in Volt	+0,1801	+0,1790	+0,1485	+0,1425	+0,1010	+0,1244
	gegen Kalomelelektrode.					
Berechnetes Potential E_0 von Hämoglobin in Volt	+ 0,049	+ 0,053	+ 0,058	+ 0,056	+ 0,030	+ 0,053
	gegen Normalwasserstoffelektrode					
Gleichgewichtskonstante $K = k_{co} \frac{HbCO \cdot K_3FeCy_6}{HbOH \cdot K_4FeCy_6 \cdot p_{co}}$	$3,5 \cdot 10^{-7}$	$2,8 \cdot 10^{-7}$	$4,7 \cdot 10^{-7}$	$3,5 \cdot 10^{-7}$	$4,8 \cdot 10^{-7}$	$4,1 \cdot 10^{-7}$

Die Konzentrationen sind in $\frac{cmm}{ccm}$ angegeben.

Zusammenfassung.

Es wird die Dissoziationskonstante von Kohlenoxyd-Hämoglobin in $\frac{m}{10}$ Borat $p_H = 9.5$ zwischen 3 bis 10 000 mm Brodie-Kohlenoxyddruck bestimmt. Es wird hierfür die Dissoziationskonstante von Oxyhämoglobin zwischen 100 bis 10 000 mm Brodie-Sauerstoffdruck bestimmt.

Ferner wird nicht denaturiertes Globin dargestellt, das die Nitroprussidnatriumreaktion auf SH zeigt, und dessen SH-Gruppen durch Ferricyanid und schon durch Sauerstoff in alkalischer Lösung oxydiert werden. In einem Globin-Molekül sind von 4 Schwefelatomen 2 als SH vorhanden. Aus reduziertem Globin kann reversibles Oxyhämoglobin dargestellt werden.

Die Reaktion:

$$HbCO + K_3FeCy_6 + KOH \rightleftharpoons HbOH + K_3FeCy_6 + CO$$

führt zu einem meßbaren Gleichgewicht, das sich auch von der anderen Seite der Reaktion aus einstellt. Die Reaktion führt über freies Hämoglobin und setzt sich aus 2 Teilreaktionen zusammen:

1. $Hb + K_3FeCy_6 + KOH \rightleftharpoons HbOH + K_3FeCy_6$

2. $HbCO \rightleftharpoons Hb + CO.$

Aus dem Gleichgewicht der Reaktion:

$$K = k_{co} \cdot \frac{HbCO \cdot K_3FeCy_6}{HbOH \cdot K_4FeCy_6 \cdot p_{co}}$$

läßt sich das Oxydationspotential von Hämoglobin berechnen.

Literatur.

Zitate:

[1]) Hüfner, G.: Z. f. Physiol. Chem. **8**, 366, 1884.
Arch. f. Anat. u. Physiol. 491, 1899.
[2]) Haldane, J. S.: Journ. of Physiol. **22**, 298, 1898.
[3]) Barcroft, J.: Journ. of Physiol. **37**, 12, 1908.
[4]) Warburg, O. u. Reid, A.: Bioch. Z. **242**, 149, 1931.
[5]) Hüfner, G.: Arch. f. Anat. u. Physiol. 37, 187, 1901.
[6]) Hill, A. V.: Journ. Physiol. **40**, iv. 1910.
[7]) Haldane, J. S.: Journ. of Physiol. **22**, 231, 1898.
Haldane u. Douglas: Journ. of Physiol. **44**, 275, 1912.
[8]) Barcroft, J.: Journ. of Chem. Soc. **129**, 1146, 1926.
[9]) Hartridge, H. u. Roughton, F. J.: Proc. Roy. Soc. **104**, 398, 1923.
[10]) Warburg, O.: Stoffwechsel der Tumoren, Berlin 1926.
[11]) Negelein, E.: Bioch. Z. **243**, 386, 1931.
[12]) Wu, H.: Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. **26**, 741, 1929.
[13]) Anson, M. L. u. Mirsky, A. E.: Journ. of Gen. Physiol. **14**, 605, 1931.
[14]) Hopkins, F. G.: Bioch. Journ. **586**, 1924.
[15]) Mecklenburg, W.: Z. f. angew. Chem. **67**, 322, 1910.
[16]) Michaelis, L.: Z. f. Physiol. Chem. **152**, 187, 1926.
[17]) Debye, P. u. Hückel: Phys. Z. **49**, 204, 1924.
[18]) Conant, J.: Journ. of Physiol. **57**, 401, 1923.
Conant, J. u. Fieser: Journ. of Physiol. **62**, 596, 1924.
[19]) Cremer, W.: Bioch. Z. **206**, 228, 1929.
[20]) Gaede-Straub: Bioch. Z. **165**, 247, 1925.
[21]) Warburg, O. u. Negelein, E.: Bioch. Z. **244**, 20, 1931.
[22]) Pregl, F.: Quantitative Organische Mikroanalyse, Berlin 1930.
[23]) Michaelis, L. u. Symthe, C. V.: Journ. of Biol. Chem. **94**, 331, 1931.

Es ist mir eine ehrenvolle Pflicht, Herrn Professor Dr. O. Warburg und Herrn Dr. E. Negelein für die Ratschläge und Belehrungen, die sie mir bei der Ausführung dieser Arbeit zuteil werden ließen, ergebenst zu danken.

Lebenslauf.

Geboren wurde ich, Herbert Schüler, am 26. August 1909 zu Berlin-Steglitz als Sohn des Bankbeamten Otto Schüler. Ich besuchte das Gymnasium zu Berlin-Steglitz, an dem ich Ostern 1928 die Reifeprüfung bestand. Dem Chemiestudium ging ich an der Universität Berlin nach, wo ich das Verbandsexamen bei Herrn Prof. Dr. Schlenk und Herrn Prof. Dr. Bodenstein im Januar 1931 ablegte. Danach war ich mit der Abfassung vorstehender Arbeit im Kaiser-Wilhelm-Institut für Zellphysiologie beschäftigt.